

氏 名	森 下 良 一
学位(専攻分野の名称)	博 士 (バイオサイエンス)
学 位 記 番 号	甲 第 710 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 28 年 3 月 20 日
学 位 論 文 題 目	BMAL1/CLOCK によって産生されるサーカディアン転写リズムに対する細胞内情報伝達因子群の役割の解析
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・博士(農学) 喜 田 聡 教 授・農学博士 河 野 友 宏 教 授・農学博士 千葉櫻 拓 博士(医学) 中 澤 敬 信*

論文内容の要旨

地球上のほぼ全ての生物は内因的な生物時計 (circadian clock) を有しており, 生物時計が様々な生命現象に見られるサーカディアンリズムを産み出している。哺乳類において, 生物時計によるサーカディアンリズム産生の分子基盤は, 時計遺伝子である転写調節因子 BMAL1 と CLOCK とのヘテロ二量体による標的遺伝子のリズム性の転写制御である。現在までに, BMAL1/CLOCK による転写活性化を起点とする, 転写・翻訳・翻訳後修飾を介した正と負の転写翻訳フィードバックループによってリズム性の遺伝子発現が産生されることが明らかとなっている。

興味深いことに, BMAL1/CLOCK によるリズム性の転写制御は生物時計の中核である視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus ; SCN) のみならず, 末梢組織にも同様に観察され, SCN はマスタークロックとして, 末梢の生物時計を同調する役割を果たしていると考えられている。重要なことに, 生物時計は光をはじめとする外的な刺激や食事などによっても調整されており, 生体内外の環境変化を受けて順応することも知られている。以上のように, 末梢細胞の生物時計は, SCN からのトップダウン制御と体内外の環境変化に対する反応により, 個々の転写リズムを調整していることは確かであるものの, 末梢組織の細胞内において転写リズムが調整を受ける分子メカニズムは不明である。以上の背景から, 本研究では, 細胞内情報伝達因子群にフォーカスし, 生体内の環境変化に応じて細胞内で転写リズムが調節されるメカニズムを解明することを目的とした。

1. BMAL1/CLOCK を介した標的遺伝子の転写制御機構に対する PI3K の役割

情報伝達因子群の選択的阻害剤を用いたスクリーニングによって, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) が BMAL1/CLOCK 標的遺伝子 Dbp の mRNA 発現量を正に制御することが示唆された。PI3K はイノシトールリン脂質をリン酸化することでセカンドメッセンジャーである Phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate (PIP₃) 産生に寄与し, 細胞の増殖, 生存, 糖代謝などに重要な役割を果たしている。PI3K は末梢の生物時計を調節する細胞内メディエーターとしての役割を果たすことが示唆されているものの, BMAL1/CLOCK を介した転写リズム制御に対する役割は未だ不明である。そこで, PI3K による BMAL1/CLOCK を介した遺伝子発現制御機構を解析した。

1-1. BMAL1/CLOCK 標的遺伝子の mRNA 発現レベルに対する PI3K 薬理的阻害の影響の解析

NIH3T3 細胞において Dbp mRNA 発現レベルに対する PI3K 選択的阻害剤 (LY294002) 添加の影響を解析した。各細胞の転写リズムを同調させるため, 2 時間の 50% ウマ血清による処理 (血清ショック ; serum shock) を行った。Serum shock 終了時を起点として, 6 時間毎に, Dbp mRNA 発現レベルを real-time PCR 法により解析した。その結果, 過去の報告と一致して, Serum shock 18 時間後をピークとした Dbp mRNA 発現変動が観察された。続いて, この同調系において, Serum shock 時及びその後の培地に LY294002 添加し, その影響を解析した結果, 最大濃度 (50 μ M) の LY294002 添加による Dbp mRNA 発現量の劇的な低下, さらには, LY294002 による発現量低下の濃度依存性が観察された。

* 大阪大学 特任准教授

また、PI3K 情報伝達経路下流の基質である Akt のリン酸化レベルを指標にしたウエスタンブロット分析により、本実験系における LY294002 の PI3K 活性阻害効果を検証した結果、LY294002 の添加により Akt のリン酸化が消失することが観察され、一方で、total Akt 量には変化が認められなかったことから、LY294002 添加が PI3K の活性を阻害していることが示された。以上の結果から、PI3K を中心とする情報伝達経路が Dbp mRNA 量を正に制御することで、Dbp mRNA のリズム性発現制御に貢献することが示唆された。

1-2. Dbp mRNA 発現レベルに対する内因性 PI3K 触媒サブユニット p110 ノックダウンの影響の解析

PI3K は触媒サブユニットと調節サブユニットにより構成され、NIH3T3 細胞では、触媒サブユニットに p110 α および p110 β の 2 種類のアイソフォームが存在する。そこで、Dbp 発現制御に対する p110 α と p110 β の役割を明らかにするため、shRNA を用いて Dbp mRNA 量に対する p110 α あるいは p110 β のノックダウンの影響を解析した。その結果、p110 β のノックダウンにより Dbp mRNA 量の有意な低下が観察されたが、p110 α のノックダウンでは変化が観察されなかった。以上の結果は、薬理学的解析の結果と一致して PI3K 活性が Dbp mRNA 量を正に制御し、特に、この制御に p110 β 触媒サブユニットが寄与していることが示唆された。

1-3. Dbp 遺伝子の転写制御に対する PI3K の役割の解析

PI3K による Dbp mRNA 量の発現制御の分子機構を明らかにすることを試みた。まず、Serum shock 直後から LY294002 添加を行っても、Serum shock の 18 時間後に Dbp mRNA 発現量の顕著な低下が観察された。従って、1-1 で観察された LY294002 添加による Dbp mRNA 量の低下は、Serum shock 時の転写リズムの同調が損なわれたためではないことが示唆された。さらに、LY294002 添加による Dbp mRNA 発現量の低下は添加時間の長さ依存的に大きくなったものの、3 時間処理によっても有意な mRNA 量の低下が観察された。以上の結果から、PI3K が Dbp mRNA の発現量を直接的に制御すること、特に、LY294002 添加後数時間以内でその影響が現れることから、mRNA 合成の早い段階、すなわち、PI3K は Dbp 遺伝子の転写を制御する可能性が示唆された。

続いて、Dbp 遺伝子の転写制御に対する PI3K の役割を明らかにするために、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイにより、Dbp 遺伝子プロモーターからの転写活性を解析した。その結

果、LY294002 添加濃度依存的に Dbp プロモーターからの転写量の減少が観察された。さらに、BMAL1/CLOCK を共発現させた場合には、LY294002 添加による Dbp 遺伝子プロモーターからの転写活性の低下率がより大きくなることが観察された。また、BMAL1/CLOCK 標的遺伝子 Per2 遺伝子プロモーターのレポーターアッセイにおいても同様の結果が観察された。従って、PI3K が BMAL1/CLOCK を介して Dbp 遺伝子プロモーターの転写活性を正に調節することが示唆された。

次に、PI3K による BMAL1/CLOCK を介した Dbp 遺伝子の転写制御機構を明らかにするため、BMAL1 抗体および CLOCK 抗体を用いた Chromatin Immunoprecipitation(ChIP)-qPCR 解析により、Dbp 遺伝子内で E-box がそれぞれ存在する 2 つの領域（プロモーター領域と 2nd intron 領域）への BMAL1/CLOCK の結合に対する PI3K の役割を解析した。その結果、BMAL1 抗体および CLOCK 抗体によるこれら E-box 領域の特異的沈降が検出され、LY294002 の添加はこれらの特異的沈降を阻害することが観察された。一方、E-box 配列が存在しないネガティブコントロール領域（Clock exon6）では、各抗体による特異的沈降は観察されなかった。従って、PI3K は BMAL1/CLOCK の E-box 配列への結合を正に制御することが示唆された。

1-4. BMAL1/CLOCK の二量体形成に対する PI3K の役割の解析

BMAL1 と CLOCK はヘテロ二量体を形成した後に、DNA 上の E-box 配列に結合するため、PI3K がこのヘテロ二量体を制御する可能性がある。そこで、共免疫沈降解析および GAL4 one-hybrid assay により BMAL1 と CLOCK の二量体形成に対する PI3K 活性阻害の影響を解析した。共免疫沈降解析の結果、NIH3T3 細胞に強制発現させた Myc-BMAL1 と Myc-CLOCK との発現レベルに LY294002 添加の影響は観察されなかった一方で、BMAL1 と CLOCK の共沈降効率は有意に低下することが観察された。この結果に一致して、GAL4 one-hybrid assay では、GAL4 DNA 結合ドメインを融合させた BMAL1 あるいは CLOCK が GAL4 応答領域を介してプロモーター上に結合した条件下において、LY294002 添加により BMAL1/CLOCK を介した転写活性化が阻害されることが観察された。従って、PI3K が BMAL1 と CLOCK のヘテロ二量体形成を促進することが示唆された。

1-5. 結論及び考察

以上より、PI3K は Dbp mRNA 量を正に制御し、さ

らに、このメカニズムとして、PI3K は、BMAL1 と CLOCK のヘテロ二量体化、その後の Dbp 遺伝子プロモーター領域の E-box 配列への結合を正に制御することが示された。以上の結果から、PI3K 情報伝達経路が BMAL1/CLOCK を標的として Dbp 遺伝子の転写リズムを制御すると結論した。

2. BMAL1/CLOCK を介した標的遺伝子の転写制御機構に対する CREST の役割

Calcium Responsive Transactivator (CREST) は、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇依存的に活性化される転写仲介因子であり、胎児期における神経細胞の樹状突起の発達に必須であることや、成長後も海馬、小脳、及び嗅球で発現していることが報告されている。所属研究室では、CREST のノックダウンにより BMAL1/CLOCK 標的遺伝子群の発現量が低下すること、さらに、CREST が Per1 のプロモーター活性を正に制御することが発見され、CREST が BMAL1/CLOCK の転写コアクチベーターとして機能することが示唆されている。そこで、CREST がカルシウムイオン情報伝達経路の下流因子として外因的なシグナルを BMAL1/CLOCK 転写制御に媒介するとの仮説を立て、本研究では、この仮説の検証として、分子生物学的手法、マウス遺伝学的手法を用いて、BMAL1/CLOCK を介した転写制御機構に対する CREST の役割の解明を試みた。

2-1. 共免疫沈降法を用いた BMAL1/CLOCK と CREST との相互作用解析

NIH3T3 細胞に CLOCK, BMAL1 及び CREST を強制発現させた場合には、CLOCK 抗体および BMAL1 抗体を用いた共免疫沈降によって、CREST が沈降することが観察された。この結果に一致して、CREST 抗体を用いた免疫沈降によって BMAL1 および CLOCK が共沈降することが観察された。従って、CREST と BMAL1/CLOCK が直接的あるいは間接的な相互作用を介して、複合体内に存在することが示唆された。

2-2. *in vivo* ChIP-qPCR を用いた BMAL1/CLOCK 標的遺伝子群のプロモーター領域への CREST の結合状態の解析

マウス海馬から調製したクロマチン産物を用いて *in vivo* ChIP-qPCR を行った。過去の報告に一致して、CREST 抗体によって c-fos プロモーター領域の特異的免疫沈降が確認された。重要な点として、同様に、Control IgG に比較して CREST 抗体による Dbp 及び Per1 遺伝子の E-box を含むプロモーター領域の特異的沈降が観察された。一方、E-box を含まないネガティブ

コントロール領域では特異的沈降は確認されなかった。従って、BMAL1/CLOCK 標的遺伝子群の E-box 領域に CREST が存在することが示唆された。

2-3. Crest コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製と解析

2-3-1 Crest 遺伝子コンディショナル変異マウスの作製

loxP 配列を Crest 遺伝子の exon4 と 5 の 5'側及び 3'側に挿入させた Crest-flox マウスを作製した。この flox マウスを全身で Cre-recombinase を発現する CAG-Cre マウスあるいは大脳皮質、海馬、嗅球の興奮性ニューロン特異的に Cre-recombinase を発現する Emx1-Cre マウスと交配させた。loxP 配列の組込みと Crest exon4-5 の欠失は尾より調製したゲノム DNA あるいは前脳より調製した mRNA の解析により確認した。野生型 (WT) マウスと比較して、CREST 遺伝子ヘテロ欠損を示す Crest-flox/CAG (+/-) マウスの海馬では、約 50% の CREST mRNA 発現量が観察され、一方、Emx1 特異的 CREST 遺伝子ホモ欠損コンディショナル変異マウス Crest-flox/Emx1-Cre (-/-) の海馬では、約 10% 程度の CREST mRNA 発現量が観察され、CREST 遺伝子の欠損が発現レベルで確認された。

2-3-2 Crest 遺伝子 exon4-5 の欠失により産生される Δ CREST の機能解析

CREST-flox 遺伝子座からは、loxP 配列の組み換えによる exon 4 と 5 の欠失後には、exon3 と 6 が連結された mRNA が産生され、この場合、フレームシフトにより exon6 内に現れる stop コドンまでの 240bp がアミノ酸に翻訳されることが予想される。まず、CREST 変異マウスから調製した total RNA を用いて cDNA を作製し、 Δ CREST をクローニングして、塩基配列を確認した。その結果、予想と一致して、exon3 と exon6 が連結され、フレームシフトのために予想される位置に終止コドンが出現する mRNA が転写されていることが確認された。さらに、GAL4 one-hybrid assay を用いて BMAL1/CLOCK を介した転写活性化能に対する Δ CREST 共発現の影響を解析した結果、 Δ CREST の共発現は BMAL1/CLOCK による転写活性化に影響を与えないことが観察され、 Δ CREST は BMAL1/CLOCK に対するコアクチベーターとして機能しないことが示された。

2-3-3 Crest 変異マウス海馬における BMAL1/CLOCK 標的遺伝子発現量の解析

BMAL1/CLOCK による発現制御に対する CREST の欠損の影響を解析するため、real-time PCR 法を用いて 12h/12h の明暗周期下で飼育した Crest-flox/CAG (+/-)

マウスの海馬の発現解析を行った結果、WT マウスと比較して、Dbp 及び Per1 の mRNA 発現量並びに、そのリズム性発現にはヘテロ欠損の影響は観察されなかった。この理由として、ヘテロ欠損による CREST 発現量の約 50% の低下は BMAL1/CLOCK の標的遺伝子の発現に影響を及ぼさない可能性が考えられた。

2-4. 結論及び考察

本研究により、CREST は E-box 上で BMAL1/CLOCK と複合体を形成し、時計遺伝子群の転写制御に貢献することが示唆された。また、Crest 遺伝子コンディショナル変異マウスの作製に成功した。今後、この Crest 変異マウス群を用いた RNA-seq、あるいは ChIP-seq に

より、CREST 標的遺伝子群を網羅的に探索することで、サーカディアン転写リズム制御機構の分子基盤の解明に貢献できると考えられた。

3. 総括

本研究結果から、PI3K による BMAL1/CLOCK を介したリズム性転写調節機構の存在が初めて明らかとなり、また、CREST が Ca^{2+} 情報伝達下流因子として BMAL1/CLOCK を介する転写を調節することが示唆された。以上のように、本論文において、細胞内情報伝達因子群による BMAL1/CLOCK を介した転写リズム調節機構の一端が明らかとなった。

審査報告概要

哺乳動物の有する約 24 時間周期の生物時計は、多様な外部環境の変動に適応しているものの、細胞レベルの転写リズムが外的シグナルに順応する細胞内分子機構は未だ不明である。本研究では、この外的シグナルに応じたリズム性転写調節機構の分子基盤を理解するために、外的シグナルを媒介する細胞内情報伝達因子群を同定し、これら因子群により BMAL1/CLOCK による転写制御を調節する分子機構の解明を試みた。まず、情報伝達因子群の選択的阻害剤を用いたスクリーニングから、Phosphatidylinositol 3-Kinase が BMAL1/CLOCK の二量体化を促進して、BMAL1/CLOCK 標的遺伝子 Dbp のプロモーター上への誘引が促進されることにより、DBP mRNA 発現量が正に制御されることを示した。続いて、カルシウムイオン情報伝達因子である転写因子

CREST が BMAL1/CLOCK と同一複合体を形成し、BMAL1/CLOCK 標的遺伝子群のプロモーターに誘引されることを示した。以上、本研究において、細胞内情報伝達因子群による BMAL1/CLOCK を介した転写リズム調節機構の一端が明らかとなった。

主査および副査から審査報告がなされ、専攻内可否を審議した。その結果、学位請求者の経歴や学術業績が学位記申請の要項を満たしていること、外国語を含む最終試験に合格していること、学位請求論文の研究内容や発表会での質疑応答の内容が十分であることが認められた。

よって、審査員一同は博士（バイオサイエンス）の学位を授与する価値があると判断した。